

Renata Soćko

Małgorzata Kupczewska-Dobecka

CZY DICHLOROMETAN JEST KANCEROGENEM ZAWODOWYM?

IS DICHLOROMETHANE AN OCCUPATIONAL CARCINOGEN?

Zakład Informacji Naukowej

Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera, Łódź

STRESZCZENIE

Dichlorometan jest szeroko stosowany w Polsce i na świecie jako fumigant owadobójczy w przechowywaniu owoców i nasion, w produkcji tworzyw poliuretanowych, w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym i spożywczym. Jest składnikiem środków gaśniczych i czynnikiem chłodzącym w chłodziarkach. Ze względu na szerokie zastosowanie dichlorometanu i znaczną liczbę osób narażonych, oraz wielokładowe działanie toksyczne tego związku, istotne jest określenie ryzyka zawodowego związanego z narażeniem na dichlorometan. Obowiązujące dotychczas w Polsce wartości normatywów higienicznych dichlorometanu (NDS: 20 mg/m³, NDSCh: 50 mg/m³) zostały zaproponowane w oparciu o działanie rakotwórcze tego związku. W świetle badań doświadczalnych oraz danych epidemiologicznych nie można jednak wiązać ryzyka zawodowego narażenia na dichlorometan z działaniem rakotwórczym tego związku, lecz z jego wpływem na ośrodkowy układ nerwowy. Med. Pr. 2007;58(2):143–153

Słowa kluczowe: dichlorometan, działanie rakotwórcze, normatywy higieniczne

ABSTRACT

Dichloromethane (DCM) has been widely used in Poland and worldwide as a pesticide fumigant to preserve seed and fruit, in the manufacture of polyurethane, in the cosmetic, pharmaceutical and food-processing industry. It is also used as an ingredient of fire extinguishing formulations and as a cooling agent in refrigerators. Because of dichloromethane's widespread use, its multisystemic toxic activity and a significant number of the exposed people, it is important to assess occupational risk for dichloromethane. In Poland, the maximum admissible concentration of dichloromethane based on its carcinogenic effect is MAC TWA 20 mg/m³ and MAC STEL 50 mg/m³. However, according to experimental and epidemiological data, occupational risk associated with DCM use is attributable to its effect on central nervous system rather than to its carcinogenic activity. Med Pr 2007;58(2):143–53

Key words: dichloromethane, cancer, MAC value, STEL value

Adres autorek: ul. św. Teresy 8, 91-348 Łódź, e-mail: socko@imp.lodz.pl

Nadesłano: 09.03.2007

Zatwierdzono: 11.04.2007

WSTĘP

Dichlorometan (DCM, chlorek metylenu) jest bezbarwną, lotną cieczą szeroko stosowaną w Polsce i na świecie. Według danych statystycznych w latach 1990–1993 na terenie 15 państw Unii Europejskiej około 250 tys. ludzi było zatrudnionych w narażeniu na DCM. Ogólna liczba osób w Polsce narażonych zawodowo na ten związek jest znaczna i szacuje się ją na kilka tysięcy. Dichlorometan stosowany jest jako rozpuszczalnik, środek spieniający w produkcji tworzyw poliuretanowych, składnik zmywaczy do farb i lakierów, środek odtłuszczający oraz propelent w opakowaniach aerozolowych lakierów do włosów. W przemyśle farmaceutycznym wykorzystywany jest do produkcji sterydów, antybiotyków i witamin, a w przemyśle spożywczym do ekstrakcji tłuszczów jadalnych i innych substancji naturalnych. Jest składnikiem środków gaśniczych i czynnikiem chłodzącym w chłodziarkach. Używa się go jako fumigantu owadobójczego w przechowywaniu owoców i nasion.

Według danych Państwowej Inspekcji Sanitarnej z 2006 r. niektóre zakłady pracy, w których DCM jest stosowany w procesie technologicznym, nie są w stanie przestrzegać obowiązujących w Polsce wartości normatywów higienicznych tej substancji. Mimo podjęcia przez pracodawców szeregu działań korygujących, mających na celu m.in. usprawnienie istniejącej wentylacji miejscowej, nadal notuje się dwukrotne przekroczenia obowiązujących wartości NDS oraz czterokrotne przekroczenia wartości chwilowych.

Ze względu na szerokie zastosowanie dichlorometanu i znaczną liczbę osób narażonych, oraz wielokładowe działanie toksyczne tego związku, istotne jest dokładne określenie ryzyka zawodowego związanego z narażeniem na DCM. Obowiązujące dotychczas w Polsce wartości normatywów higienicznych DCM (NDS: 20 mg/m³, NDSCh: 50 mg/m³) zostały zaproponowane w oparciu o rakotwórcze działanie tego zwią-

ku (1). Czy jednak w świetle badań doświadczalnych oraz danych epidemiologicznych można wiązać ryzyko zawodowego narażenia na DCM z rakotwórczym działaniem tego związku? Na to pytanie postaramy się odpowiedzieć w niniejszej pracy.

CEL PRACY

Celem pracy jest określenie ryzyka związanego z narażeniem zawodowym na dichlorometan na podstawie przeglądu dostępnych danych literaturowych. Czy w świetle badań doświadczalnych oraz danych epidemiologicznych można uznać DCM za kancerogen zawodowy? Zwrócono uwagę, że w światowych wykazach dopuszczalnych poziomów narażenia zawodowego w większości państw dopuszczalne stężenie DCM ustalono na znacznie wyższym poziomie niż w Polsce, tj. w zakresie stężeń od 174 do 350 mg/m³. Czy podwyższenie obowiązujących w Polsce wartości normatywnych higienicznych DCM zwiększy ryzyko związane z narażeniem na ten związek?

DZIAŁANIE TOKSYCZNE U LUDZI

Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 28 września 2005 r. w sprawie wykazu substancji niebezpiecznych wraz z ich klasyfikacją i oznakowaniem (DzU z 2005 r. nr 201, poz. 1674) dichlorometan został urzędowo zaklasyfikowany jako substancja o możliwym działaniu rakotwórczym na człowieka (rakotw. kat. 3); Ograniczone dowody działania rakotwórczego (R40).

Toksyczność ostra

W przypadkach ostrych zatruc zawodowych DCM głównymi skutkami narażenia są: zaburzenia czynności ośrodkowego układu nerwowego (OUN) i podwyższenie poziomu karboksyhemoglobiny (COHb) we krwi (2–5). U narażonych osób występowały bóle i zawroty głowy, senność, osłabienie, ośpienie, dezorientacja, dreszcze, nudności, wymioty, biegunka, uczucie drętwienia i mrowienia w kończynach (6–10). Niekiedy dochodziło do utraty przytomności (11,12).

Oszacowano, że stężenie 70 600 mg/m³ DCM jest stężeniem śmiertelnym (13–15,9,16). Najczęstszą przyczyną śmierci było zaburzenie funkcjonowania OUN (16). W pojedynczych przypadkach w przebiegu ostrego inhalacyjnego zatrucia DCM stwierdzano obrzęk płuc (17) i martwicę komórek nabłonka kanalików nerkowych (8).

Lehman i Flury (18) oszacowali, że DCM w stężeniu 25 416 mg/m³ powodował parestezję dystalnych odcinków kończyn po 8 min od ekspozycji.

Zmiany neurobehawioralne (zaburzenia koncentracji i gorsze wyniki w stosowanych testach behawioralnych) stwierdzano po 1,5–3-godzinnym narażeniu na pary DCM o stężeniu 694 mg/m³ (19). Progowa wartość czucia uległa obniżeniu po 95-minutowym narażeniu na ten związek w stężeniu 1040 mg/m³ (20). Zaburzenia wzrokowych potencjałów wywołanych występowały po 1-godzinnym narażeniu na pary związku o stężeniu 2400 mg/m³ (21).

Istotne zaburzenia reakcji, takich jak spowolnienie reakcji ruchowych, osłabienie koordynacji ruchowej, gorsze wyniki trafiania w ruchomy cel, stwierdzono u osób narażonych na DCM w stężeniu 2824 mg/m³ w ciągu 3–4 godzin. Powyższych zmian nie wywoływał DCM podany w stężeniach 353 mg/m³; 706 mg/m³; 882,5 mg/m³ (22–24).

Czterogodzinne narażenie na DCM w stężeniu 2610 mg/m³ powodowało obniżenie wydolności psychomotorycznej, a narażenie na DCM w stężeniu 1059 mg/m³; 1765 mg/m³; 2824 mg/m³ wywoływało istotne zaburzenia reakcji na bodźce słuchowe i obniżenie progowej wartości czucia u 12 osób (25).

Na podstawie powyższych danych amerykańscy higieniści przemysłowi sugerują, że wartość 706 mg/m³ można przyjąć jako wartość LOAEL (lowest observed adverse effect level — najniższy poziom działania szkodliwego) dla działania ostrego dichlorometanu na OUN (26).

Toksyczność przewlekła

Podobne objawy jak w zatruciu ostrym obserwuje się po ekspozycji przewlekłej.

Za pomocą testów elektrofizjologicznych (test badania funkcji rozpoznawania polegający na pomiarze czynności bioelektrycznej mózgu: zmiany latencji i amplitudy badanych fal mózgowych, test PM-karbinol badający amplitudę potencjału czynnościowego wytworzonego w komórkach węchowych, test widzenia barw, test siły chwytu), testów psychofizycznych (badanie prędkości motorycznej, test reakcji prostej, test wyboru z użyciem systemu oceny neurobehawioralnej NES) oraz testów psychologicznych (test pamięci wzrokowej i werbalnej oraz 6 testów uwagi), przeprowadzonych u 25 emerytowanych mechaników linii lotniczych, którzy co najmniej 6 lat byli zatrudnieni w narażeniu na DCM w zakresie stężeń 353–794 mg/m³, nie stwierdzono trwałych zaburzeń w OUN (27). Stąd wartość NOAEL (no-observed adverse effect level — poziom bez obserwowanego działania szkodliwego) dla działania przewlekłego na OUN oscyluje w granicach 353–794 mg/m³.

Stwierdzono liniową zależność między poziomem narażenia na DCM a poziomem COHb we krwi (28,29). U pracowników narażonych zawodowo na DCM o stężeniu średnim 114 mg/m^3 stężenie karboksyhemoglobiny we krwi wynosiło od 0,8 do 2,5%. Nie stwierdzono innych nieprawidłowości w obrazie krwi i zmian elektrokardiograficznych. Obliczono, że wzrost COHb o 1% jest związany z 7,5-godzinnym narażeniem na DCM w stężeniu 90 mg/m^3 lub 24-godzinnym narażeniem na stężenie 28 mg/m^3 (30). Oszacowano, że 24-godzinne narażenie na DCM w stężeniu 3 mg/m^3 powoduje podwyższenie COHb o 0,1% (31).

Badania epidemiologiczne

Badania epidemiologiczne przeprowadzone u pracowników zatrudnionych przy produkcji włókien sztucznych z diocyanu i triocyanu celulozy, eksponowanych na DCM w stężeniach: $494,2 \text{ mg/m}^3$, $988,4 \text{ mg/m}^3$ i $1676,7 \text{ mg/m}^3$, nie ujawniły zmian patologicznych, które byłyby związane z toksycznym działaniem DCM (32–35). U osób narażonych nie obserwowano zależnych od stężenia DCM zaburzeń czynności wątroby, z wyjątkiem wzrostu poziomu bilirubiny osocza i wzrostu poziomu transaminazy alaninowej. Wyniki badań hematologicznych osób narażonych nie różniły się od wyników tych badań osób z grupy referencyjnej (34).

Całodobowe monitorowanie czynności serca u 24 osób narażonych i 26 nienarażonych, ale pracujących mężczyzn, nie ujawniło zaburzeń czynności bioelektrycznej pozakomorowej i nadkomorowej serca w wyniku narażenia na DCM w stężeniach od 158,8 do $211,8 \text{ mg/m}^3$ (35).

W innych badaniach epidemiologicznych dokonano analizy wskaźników umieralności proporcjonalnej, w której uwzględniono wszystkie zgony w latach 1956–1976 wśród osób emerytowanych, będących na rencie, i aktualnie zatrudnionych pracowników zakładów wytwarzających środki fotograficzne (36). Stężenia DCM wahały się w granicach 0– $1235,5 \text{ mg/m}^3$. W latach 1966–1975 stwierdzono zmniejszenie się średniego stężenia z 419 mg/m^3 do 142 mg/m^3 . Pracownicy lub byli pracownicy tych samych zakładów pracy, niemający kontaktu z DCM, którzy zmarli w latach 1956–1976 stanowili populację kontrolną. Nie stwierdzono istotnych różnic we wskaźnikach specyficznej umieralności proporcjonalnej. W populacji narażonej, we wszystkich kolejnych badanych latach, nie stwierdzono zwiększenia umieralności z powodu chorób układu krążenia, nowotworów złośliwych lub innych stanów chorobowych.

Hearne i wsp. (37) przeprowadzili badania wśród mężczyzn zatrudnionych średnio 30 lat w zakładach wytwarzających środki fotograficzne w latach 1964–1970. Średni czas narażenia wynosił 22 lata. Średnie 8-godzinne narażenie na DCM w badanej kohorcie wynosiło $91,7 \text{ mg/m}^3$. Wśród narażonych stwierdzono mniejszą niż spodziewaną, całkowitą liczbę przypadków śmiertelnych spowodowanych chorobami płuc i nowotworami układu pokarmowego. Badania nie ujawniły zależności dawka–odpowiedź.

Tę samą kohortę badali do 1986 r. także Lanes i wsp. (38). W badanym okresie zarejestrowano w niej 122 przypadki śmiertelne. Nie obserwowano wzrostu śmiertelności z powodu raka piersi, trzustki, układu oddechowego i choroby niedokrwiennej serca. Zarejestrowano natomiast przypadki śmiertelne z powodu raka jamy ustnej i gardła [2 obserwowane vs 0,9 spodziewanych, SMR — standaryzowany wskaźnik zgonów: 2,3; 95% CI (przedział ufności): 0,4–7,6] oraz istotnie statystycznie nadwyżki raka wątroby i przewodów żółciowych (4 obserwowane vs 0,7 spodziewanych, SMR: 5,8; 95% CI: 1,8–13,8) i czerniaka (2 obserwowane vs 0,9 spodziewanych, SMR: 2,3; 95% CI: 0,4–7,5). W grupie nowotworów wątroby i przewodów żółciowych były 3 przypadki raka przewodów żółciowych vs 0,15 spodziewanych i 1 przypadek gruczolakoraka wątroby.

Lanes i wsp. (39) kontynuowali badania tej samej kohorty przez następne 4 lata aż do 1990 r. Dokonali analizy przyczyn 50 zgonów wśród 172 osób w kohorcie. Nie stwierdzili zgonów z powodu raka wątroby i przewodów żółciowych, z wyjątkiem przypadków we wcześniejszych badaniach (4 obserwowane vs 0,7 spodziewanych, SMR: 5,8; 95% CI: 1,8–13,8). Nie była również znamienna liczba zgonów z powodu raka trzustki (2 obserwowane vs 2,42 spodziewanych, SMR: 0,8; 95% CI: 0,1–3,0) i choroby niedokrwiennej serca (43 obserwowane vs 47,8 spodziewanych, SMR: 0,9; 95% CI: 0,6–1,2). Autorzy badań konkludują, że wzrost śmiertelności w badanej kohorcie z powodu raka wątroby i przewodów żółciowych był „niestabilny statystycznie”.

Gibbs i wsp. (40) badali kohortę ludzi białych (2187 mężczyzn i 1024 kobiet) eksponowanych na DCM przez 11 lat (najkrótszy czas narażenia 3 miesiące) w zakładach produkujących triocyan celulozy. Badanych pracowników podzielono na 3 grupy: do pierwszej należały osoby narażane na DCM w stężeniach wysokich: $1206,9$ – $2413,8 \text{ mg/m}^3$, do drugiej — niskich: $172,4$ – $344,8 \text{ mg/m}^3$, a trzecią grupę stanowiła kontrola. Osoby narażone obserwowano jeszcze przez następne 9 lat od zakończenia ekspozycji. W prze-

działach 5-letnich, od roku 1970 do 1989, wyznaczano stosunek zgonów obserwowanych do spodziewanych oraz wyliczono wartości standaryzowanych wskaźników zgonów dla 62 przypadków śmiertelnych i porównywano je z grupą kontrolną. Wystąpiło mniej przypadków śmiertelnych w stosunku do spodziewanych z powodu raka oskrzeli, płuc, tchawicy i trzustki. Nie stwierdzono raka wątroby i przewodów żółciowych. W obu grupach narażanych mężczyzn wystąpił wzrost liczby zgonów z powodu raka prostaty, a w przypadku kobiet wzrost liczby zgonów spowodowany był rakiem szyjki macicy i wystąpił tylko w grupie osób narażanych na DCM w stężeniu niższym.

Wyniki badań epidemiologicznych nie wskazują jednoznacznie na narażenie na DCM jako przyczynę zwiększonej umieralności. Obserwowany wzrost przypadków raka przewodów żółciowych w jednej kohorcie (38) opierał się na małej liczbie zgonów. Przy dłuższym okresie obserwacji nie stwierdzono powyższych zmian w badanych kohortach. Obserwacje pracowników narażanych na DCM w stężeniach między 494,2 a 1676,7 mg/m³ lub na stężenie średnio 91,7 mg/m³ nie wykazały zależności między stężeniem DCM a wzrostem śmiertelności spowodowanej chorobą niedokrwienną serca lub zaburzeniami czynności serca (32,37,38).

DZIAŁANIE RAKOTWÓRCZE

Działanie rakotwórcze u ludzi

Wyniki badań epidemiologicznych nie wskazują na wzrost ryzyka chorób nowotworowych u osób narażonych zawodowo na DCM, ale także nie wykluczają możliwości działania kancerogennego DCM u ludzi (32–37). Ograniczenie istotności wyników pochodzących z badań Ott i wsp. (32–35) wynika m.in. z braku analizy przyczyn umieralności według kategorii poziomów ekspozycji, braku danych co do stanu zdrowia 18% osób, które zaliczono do kohorty narażonych na DCM oraz zbyt krótkiego okresu obserwacji dla wykrycia nowotworów o etiologii zawodowej. Wprawdzie Lanes i wsp. (38) obserwowali wzrost przypadków raka przewodów żółciowych w jednej kohorcie, jednak opierał się on na małej liczbie zgonów i zanikał przy dłuższym okresie obserwacji, a ponadto nie odnotowano go w żadnej innej kohorcie.

Według wiodących organizacji międzynarodowych ocena rakotwórczego działania dichlorometanu kształtuje się w następujący sposób:

- US Environmental Protection Agency (US EPA): B2 — czynnik o potwierdzonym działaniu rakotwórczym na zwierzęta i nieznanym działaniu na ludzi lub brak danych z badań epidemiologicznych (41–43).

■ International Agency for Research on Cancer (IARC): 2B — substancje o przypuszczalnym działaniu rakotwórczym dla człowieka (44,45).

- Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen (MAK): 3A — substancje, co do których podejrzewa się, że mogą działać rakotwórczo na ludzi, ale ich ostateczna ocena nie jest możliwa ze względu na brak danych (46).
- National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH): Ca — potencjalny kancerogen zawodowy (46).
- National Toxicology Program (NTP): R — substancje o możliwym działaniu rakotwórczym dla człowieka (46).
- Occupational Safety and Health Administration (OSHA): Ca — kancerogen — brak kategoryzacji (46).
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH): A3 — czynnik o potwierdzonym działaniu rakotwórczym na zwierzęta i nieznanym działaniu na ludzi (46).
- Komisja Unii Europejskiej: rakotw. kat. 3. — substancje o możliwym działaniu rakotwórczym na człowieka (47).

Działanie rakotwórcze u zwierząt

Wystarczające dowody działania rakotwórczego DCM u zwierząt uzyskano w eksperymentach na szczurach i myszach, którym podawano DCM z wodą do picia (znamienny wzrost częstości występowania łącznie raka wątrobowokomórkowego i guzków nowotworowych u samic szczurów F344 i nieznamienno u samców myszy B6C3F1) (48,49) oraz w 2 badaniach inhalacyjnych, które wykazały wzrost przypadków występowania łagodnych nowotworów sutka u obu płci szczurów Sprague-Dawley (50) oraz F344 (51). U samców szczurów Sprague-Dawley obserwowano wzrost częstości występowania mięsaka gruczołów ślinowych (50,51). U myszy obu płci B6C3F1 rozwinęły się nowotwory wątroby i płuc na skutek narażenia na DCM (51).

Narażenie drogą pokarmową

Gruczolaki i raki wystąpiły u samic i samców myszy szczepu B6C3F1, którym podawano DCM w wodzie do picia przez 104 tygodnie (tab. 1). Istotny statystycznie wzrost przypadków gruczolaka wątrobowokomórkowego i/lub raka wątrobowokomórkowego (łącznie) wystąpił jedynie u samic myszy [trend ($p = 0,035$)] (52).

Tabela 1. Zestawienie wyników badania działania rakotwórczego na myszach (52)**Table 1.** Results of carcinogenic activity test on mice (52)

| Grupa | Liczba zwierząt | Dawka (mg/kg m.c./dzień) | Liczba przypadków | Liczba przypadków | |
|-----------------|-----------------|--------------------------|---------------------------------|---------------------------|--------------|
| | | | gruczolaka wątrobowokomórkowego | raka wątrobowokomórkowego | |
| | | | ogółem | | |
| Kontrola 1 | samce | 60 | 0 | 6/60 (10%) | 5/60 (8%) |
| | samice | 50 | | 11/60 (18%) | |
| Kontrola 2 | samce | 65 | 0 | 4/65 (8%) | 9/65 (14%) |
| | samice | 50 | | 13/65 (20%) | |
| Mała dawka | samce | 200 | 60 | 20/200 (10%) | 33/200 (17%) |
| | samice | 100 | | 51/200 (25%) | |
| Średnia dawka 1 | samce | 100 | 125 | 14/100 (14%) | 18/100 (18%) |
| | samice | 50 | | 30/100 (30%) | |
| Średnia dawka 2 | samce | 100 | 185 | 14/99 (14%) | 17/99 (17%) |
| | samice | 50 | | 31/99 (31%) | |
| Wysoka dawka | samce | 125 | 250 | 15/125 (12%) | 23/125 (18%) |
| | samice | 50 | | 35/125 (28%) | |

Tabela 2. Zestawienie wyników badania działania rakotwórczego na szczurach (53)**Table 2.** Results of carcinogenic activity test on rats (53)

| Grupa | Liczba zwierząt | Dawka (mg/kg m.c./dzień) | Liczba przypadków | Liczba przypadków | |
|-----------------|-----------------|--------------------------|---------------------------------|---------------------------|------|
| | | | gruczolaka wątrobowokomórkowego | raka wątrobowokomórkowego | |
| | | | ogółem | | |
| Kontrola 1 | samce | 85 | 0 | 4/85 | 2/85 |
| | samice | 85 | | 0/85 | 0/85 |
| Kontrola 2 | samce | 50 | 0 | 5/50 | 2/50 |
| | samice | 50 | | 0/50 | 0/50 |
| Mała dawka | samce | 85 | 5 | 2/85 | 0/85 |
| | samice | 85 | | 1/85 | 0/85 |
| Średnia dawka 1 | samce | 85 | 50 | 3/84 | 0/84 |
| | samice | 85 | | 2/83 | 2/83 |
| Średnia dawka 2 | samce | 85 | 125 | 3/85 | 0/85 |
| | samice | 85 | | 1/85 | 0/85 |
| Wysoka dawka | samce | 85 | 250 | 1/85 | 1/85 |
| | samice | 85 | | 4/85 | 2/85 |

W podobnym eksperymencie u szczurów nie obserwowano znamienych różnic w przeżyciu zwierząt. U samic stwierdzono przypadki występowania raków wątrobowokomórkowych oraz gruczolaków (tab. 2). Trend był znamieny statystycznie ($p < 0,01$), jakkolwiek w stosunku do historycznych grup kontrolnych badanych w laboratorium nie uzyskano istotnej zależności. U samców nie obserwowano wzrostu przypadków występowania nowotworów wątroby tj. gruczolaków, raków oraz gruczolaków i raków łącznie (53) (tab. 2).

Myszom (50 samic i 50 samców w grupie) szczepu B6C3F1 i szczurom podawano DCM dożołądkowo

w dawce 100 mg/kg i 500 mg/kg w oliwie z oliwek, 1 raz dziennie, 4–5 dni w tygodniu, przez 64 tygodnie. Myszy z grupy kontrolnej (60 osobników) otrzymywały oliwę z oliwek. U myszy i szczurów DCM w najwyższej dawce powodował wzrost śmiertelności ($p < 0,01$) po 36 tygodniach ekspozycji. U samców myszy, które padły w 78. tygodniu badania stwierdzono nowotwory płuc: 1/14 w kontroli, 4/21 w małej dawce oraz 7/24 w wysokiej dawce ($p < 0,05$). Pod koniec eksperymentu skumulowana liczba nowotworów płuc u samców myszy wynosiła: 5/47 w kontroli, 5/21 w małej dawce oraz 9/36 w wysokiej dawce. Nie obserwowano zależności między wzrostem

występowania przypadków nowotworów u samic a występowaniem innego typu nowotworów u samców myszy. U szczurów nie obserwowano znamiennego wzrostu występowania przypadków nowotworów związanych z ekspozycją (54).

W 2-letnim badaniu National Coffee Association (48,49) grupy 85 szczurów F344/płec/dawkę otrzymywały 5, 50, 125 albo 250 mg/kg/dzień DCM w wodzie do picia. Grupę kontrolną stanowiło 135 szczurów/płec. U samic stwierdzono statystycznie znamienny wzrost przypadków występowania raków wątrobowokomórkowych oraz guzków nowotworowych w dawce 50 i 250 mg/kg w porównaniu z kontrolą (odpowiednio 0/134, 1/85, 4/83, 1/85 i 6/85 w pięciu grupach 0, 5, 50, 125, i 250 mg/kg/dzień). Wzrost przypadków wyłącznie raków wątrobowokomórkowych nie był znamienny statystycznie (0/134, 0/85, 2/83, 0/85, 2/85). Łącznie liczba przypadków raków wątrobowokomórkowych i guzków nowotworowych w kontroli i 4 grupach (na 472 szczury: 4 z rakami i 8 z guzkami nowotworowymi) była podobna do kontroli historycznej (na 419 szczurów: 5 z rakiem, 19 z guzkami nowotworowymi). U samców nie stwierdzono wzrostu występowania raków wątroby.

W równoległym badaniu National Coffee Association (48,49) myszy B6C3F1 otrzymywały 0, 60, 125, 185 lub 250 mg/kg/dzień DCM z wodą do picia. Grupy narażone składały się z 50 samic i 200, 100 i 125 samców (odpowiednio od najmniejszej do najwyższej dawki) — 100 samic i 125 samców stanowiło kontrolę. U samców obserwowano niezależny od dawki wzrost przypadków występowania łącznie raków wątrobowokomórkowych i guzków nowotworowych (24/125, 51/200, 30/100, 31/99, 35/125). Wzrost dla 2 średnich grup był statystycznie znamienny. Wzrost przypadków występowania wyłącznie raków wątrobowokomórkowych u samców nie był znamienny statystycznie (od 55 do 65% całkowitej liczby nowotworów), a u samic nie występował.

Narażenie inhalacyjne

Myszy B6C3F1 (50 samców i 50 samic w grupie) narażano całą powierzchnią ciała na DCM w stężeniu 0, 6940, 13 900 mg/m³ przez 6 godzin dziennie, 5 dni w tygodniu, przez 102 tygodnie. Zwierzęta zabijano w 104. tygodniu eksperymentu. Średnia masa ciała samców narażanych na DCM w wysokim stężeniu była porównywalna z kontrolą do 90. tygodnia narażenia, natomiast u samic była mniejsza w porównaniu z kontrolą pomiędzy 51. a 95. tygodniem narażenia. Przeżycie samców wynosiło: kontrola — 39/50; małe stężenie — 24/50; wysokie stężenie — 11/50, natomiast samic odpowiednio — 25/50,

25/49 i 8/49. Znaczący wzrost występowania nowotworów płuc i wątroby obserwowano u badanych zwierząt:

- gruczolaki pęcherzykowooskrzelikowe: samce — 3/50, 19/50 i 24/50 ($p < 0,001$); samice — 2/50, 23/48 i 28/48 ($p < 0,001$);
- raki pęcherzykowooskrzelikowe: samce — 2/50, 10/50 i 28/50 ($p < 0,001$); samice — 1/50, 13/48 i 29/48 ($p < 0,001$);
- gruczolaki wątrobowokomórkowe: samce — 10/50, 14/49 i 14/49 ($p = 0,075$); samice — 2/50, 6/48 i 22/48 ($p < 0,001$);
- raki wątrobowokomórkowe: samce — 13/50, 15/49 i 26/49 ($p = 0,016$); samice — 1/50, 11/48 i 32/48 ($p < 0,001$) (51).

Myszy B6C3F1 (68 samic w grupie) narażano całą powierzchnią ciała na DCM w stężeniu 0 i 7060 mg/m³ w różnym okresie czasu (maks. 104 tygodnie). Znaczący wzrost występowania nowotworów płuc i wątroby obserwowano u wszystkich badanych zwierząt (tab. 3) (55).

Szczury (95 samic i 95 samców w grupie) narażano na DCM w stężeniu 0, 1740, 5200, 12 100 mg/m³ przez 6 godzin dziennie, 5 dni w tygodniu przez 2 lata. Pod koniec narażenia przeżyło 14, 14, 6 i 7 samców, odpowiednio w grupie kontrolnej, z małym, średnim i wysokim stężeniem, oraz 21, 24, 13 i 4 samice. Wzrost śmiertelności samic w najwyższym stężeniu był znamienny statystycznie od 18. miesiąca narażenia. Nie obserwowano wzrostu częstości występowania zmian nowotworowych w wątrobie i nerkach u badanych zwierząt oraz znamiennego wzrostu łagodnych lub złośliwych guzów sutka, jakkolwiek w przypadku całkowitej liczby łagodnych guzów sutka (brak specyfikacji typu) wykazano słabo zależny od stężenia wzrost u samców (kontrola — 8/95; małe stężenie — 6/95; średnie stężenie — 11/95; wysokie stężenie — 17/97; $p = 0,046$) oraz u samic (165/96, 218/95, 245/95 i 287/97). Zwiększoną częstość występowania mięsaka ślinianek stwierdzono w średnim i najwyższym stężeniu u samców [1/93, 0/94, 5/91 i 11/88; $p = 0,002$ (trend $p < 0,001$)] (50).

Szczury Fischer 344/N (50 samców i 50 samic w grupie) narażano całą powierzchnią ciała na DCM w stężeniu 0, 3 470, 6940, 13 900 mg/m³ przez 6 godzin dziennie, 5 dni w tygodniu, przez 102 tygodnie. Zwierzęta zabijano w 104. tygodniu eksperymentu. Średnia masa ciała zwierząt narażanych, obu płci, oraz przeżywalność była porównywalna z kontrolą. Jedynie u samic, które otrzymywały DCM w najwyższym stężeniu, przeżywalność pod koniec eksperymentu obniżyła się i wynosiła: 15/50, 30/50 w kontroli, 22/50 — w małym stężeniu, 22/50 — w średnim. Znaczący wzrost występowania

Tabela 3. Częstość występowania nowotworów u myszy narażonych inhalacyjnie na DCM (55)
Table 3. Frequency of cancer in mice exposed by inhalation to DCM (55)

| | Stężenie dichlorometanu/czas narażenia | | | | | | | |
|--|--|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | 0 mg/m ³ | 7060 mg/m ³ | 0 mg/m ³ | 7060 mg/m ³ | 0 mg/m ³ | 7060 mg/m ³ | 0 mg/m ³ | 7060 mg/m ³ |
| | 104 tyg. | 26 tyg. | 78 tyg. | 52 tyg. | 52 tyg. | 78 tyg. | 26 tyg. | 104 tyg. |
| | | 0 mg/m ³ | 7060 mg/m ³ | 0 mg/m ³ | 7060 mg/m ³ | 0 mg/m ³ | 7060 mg/m ³ | |
| | | 78 tyg. | 26 tyg. | 52 tyg. | 52 tyg. | 26 tyg. | 78 tyg. | |
| Przeżywalność (%) | 58,8 | 47,1 | 54,1 | 34,4** | 58,8 | 35,3** | 47,1 | 40,4 |
| Płuca | | | | | | | | |
| Liczba przypadków gruczolaka | 1/67 | 8/68 | 0/67 | 12/63 | 5/67 | 19/68 | 7/67 | 18/67 |
| Liczba przypadków raka | 4/67 | 17/68 | 3/67 | 36/63 | 6/67 | 25/68 | 7/67 | 31/67 |
| Łącznie | 5/67 | 21/68** | 3/67 | 40/63** | 10/67 | 38/68** | 13/67* | 42/67** |
| Liczba zwierząt z gruczolakami lub rakami/liczba zwierząt narażanych | | | | | | | | |
| Wątroba | | | | | | | | |
| Liczba przypadków gruczolaka | 8/67 | 16/67 | 16/67 | 14/64 | 9/67 | 28/68 | 17/67 | 24/68 |
| Liczba przypadków raka | 11/67 | 14/67 | 13/67 | 18/64 | 12/67 | 25/68 | 20/67 | 35/68 |
| Łącznie | 18/67 | 27/67 | 23/67 | 28/64* | 21/67 | 42/68** | 32/67* | 47/68** |
| Liczba zwierząt z gruczolakami lub rakami/liczba zwierząt narażanych | | | | | | | | |

Liczba przypadków = liczba zwierząt z nowotworami/liczba zwierząt narażanych.
 *p < 0,05; **p < 0,01.

łagodnych nowotworów sutka (włókniakogruczolaków z wyjątkiem jednego przypadku gruczolaka w wysokim stężeniu) obserwowano u badanych samic (5/50, 11/50, 13/50 i 23/50; p < 0,001). Obserwowano statystycznie znamienne wzrost przypadków występowania gruczolaków i gruczolakowłókniaków sutka u samców (0/50; 0; 50; 2/50 i 5/50; p < 0,01). Nie obserwowano różnic w rozmieszczeniu nowotworów różnych typów między grupą kontrolną a narażanymi zwierzętami (51).

Szczury Sprague-Dawley (90 samców i 180 samic w grupie) narażano całą powierzchnią ciała na DCM w stężeniu 0, 174, 694, 1740 mg/m³ przez 6 godzin dziennie, 5 dni w tygodniu przez 20 lub 24 miesiące (odpowiednio samce i samice). Nie obserwowano statystycznie znamiennego obniżenia masy ciała i wzrostu śmiertelności zwierząt. U samic stwierdzono przypadki łagodnych nowotworów sutka (gruczolaki i włókniakogruczolaki łącznie): 52/70; 58/70; 61/70 i 55/70 (p < 0,05) odpowiednio w kontroli, z małym, średnim i wysokim stężeniem. Nie stwierdzono wzrostu częstości występowania innych nowotworów w narażanej grupie (56).

Złociste chomiki syryjskie (95 samic i 95 samców w grupie) narażano na DCM w stężeniu 0, 1740, 5200, 12 100 mg/m³ przez 6 godzin dziennie, 5 dni w tygodniu przez 2 lata. Pod koniec narażenia przeżyło 16, 20, 11 i 14 samców odpowiednio w grupie kontrolnej, z małym, średnim i wysokim stężeniem oraz 0, 4, 10

i 9 samic. Obserwowano nieznaczny wzrost (p = 0,032) częstości występowania chłoniakomięsaków u badanych samic (kontrola — 1/91; małe stężenie — 6/92; średnie stężenie — 3/91; wysokie stężenie — 7/91 (50).

PODSUMOWANIE

W wyniku badań epidemiologicznych nie udowodniono wzrostu ryzyka chorób nowotworowych u osób narażonych zawodowo na DCM, ale także nie wykluczono możliwości kancerogennego działania DCM u ludzi (32–37). Obserwowano wzrost przypadków raka przewodów żółciowych w jednej kohorcie, ale opierał się on na małej liczbie zgonów i zanikał przy dłuższym okresie obserwacji, a ponadto nie odnotowano go w żadnej innej kohorcie (38).

Dane doświadczalne dowodzą jednak rakotwórczego działania DCM u myszy w warunkach przewlekłej inhalacyjnej ekspozycji zwierząt w dużych stężeniach. Wyniki badań raportu NTP (51) dotyczące rakotwórczego działania DCM zostały zweryfikowane przez EPA (42) i ocenione pod kątem rakotwórczego działania u ludzi. Na podstawie tych badań, zakładając liniową zależność między wielkością ekspozycji a ryzykiem nowotworu (gruczolaka lub raka płuc i/lub wątroby u myszy), obliczono dodatkowe ryzyko nowotworu u ludzi w następstwie całozyciowej, inhalacyjnej hipotetycznej

ekspozycji populacji na DCM o stężeniu $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Według US EPA (57) ryzyko jednostkowe wynosi $4,7 \times 10^{-7}$. Bazując na tych wartościach, poziomy dodatkowego ryzyka nowotworu u ludzi: 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} i 10^{-7} związane są z ciągłym narażeniem na DCM odpowiednio w stężeniach: 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/m^3 . Obliczono także dodatkowe życiowe ryzyko nowotworu u ludzi, wywołane całodobowym, w ciągu całego życia, dozoładkowym narażeniem hipotetycznej populacji ludzkiej na DCM w dawce 1 $\text{mg}/\text{kg}/\text{dzień}$ i wynosi ono $1,4 \times 10^{-2}$. US EPA planuje powtórnie ocenić potencjalne ryzyko występowania raka u ludzi wynikające z narażenia na DCM drogą inhalacyjną, w oparciu o nowsze badania doświadczalne i nowsze farmakokinetyczne modelowanie wykorzystujące dozymetrię tkankową.

Dane literaturowe wskazują na 2 mechanizmy przemian DCM o charakterze detoksykacyjnym:

1. Hydroliza enzymatyczna przekształcająca DCM do formaldehydu, kwasu mrówkowego i chlorków przez frakcję cytosolową z wątroby (58–61). W tej przemianie DCM związany przez glutation ulega hydrolizie za pośrednictwem transferazy glutationowej (GST). Głównym produktem przemiany jest ditlenek węgla. Powstały S-hydroksymetyloglutation może być źródłem formaldehydu lub kwasu mrówkowego.
2. Utlenienie DCM do tlenku węgla i ditlenku węgla za pośrednictwem układu oksygenaz mikrosomalnych o mieszanej funkcji, zależnych od cytochromu P-450 (62,63,59). Początkowym etapem metabolizmu jest przyłączenie tlenu, a następnie przekształcenie do chlorku formylu, który rozkłada się do tlenku węgla.

Zdaniem wielu autorów działanie hepatotoksyczne i rakotwórcze DCM należy przypisać jego metabolitom, m.in. formaldehydowi, który powstaje w procesie hydrolizy za pośrednictwem transferazy glutationowej (klasy teta: GSTT1-1). Enzym ten jest obecny w płucach i wątrobie myszy, natomiast w tkankach płuc i wątroby u człowieka występuje w śladowych ilościach (64,65). Te dane wskazują, że u ludzi zdolność aktywacji DCM do jego aktywnego metabolitu przez tkanki płuc lub wątroby jest znacznie mniejsza. Istnieją jednak badania, które wykazały znacznie wyższy poziom GSTT1-1 mRNA w komórkach Clara oraz wyższy poziom GSTT1-2 w wątrobie u niektórych ludzi (66). Istotnie większa aktywność transferazy glutationowej w wątrobie i płucach myszy, w porównaniu z aktywnością tego enzymu u szczurów, chomików i ludzi, wyjaśniałaby, dlaczego przypadki nowotworów płuc i wątroby obserwowano u myszy, a nie u szczurów, chomików i ludzi (50,67,68).

Andersen (69,70) opracował model farmakokinetyczny PB-BK (physiologically based pharmacokinetic model) i zastosował go do ilościowego opisu metabolizmu DCM u czterech gatunków (mysz, szczur, chomik, człowiek). Stałe kinetyczne reakcji dla tego modelu wyznaczono w eksperymentach *in vivo*. Walidacja modelu polegała na porównaniu wykonanych za pomocą modelu obliczeń wielkości stężenia DCM we krwi w czasie z danymi uzyskanymi z eksperymentów. Okazało się, że częstość przypadków występowania nowotworów wątroby i płuc u zwierząt doświadczalnych, uzyskana z danych eksperymentalnych NTP, dobrze koreluje z wielkością stężenia DCM, który po związaniu przez glutation ulega hydrolizie za pośrednictwem transferazy glutationowej. Nie znaleziono natomiast korelacji między liczbą przypadków nowotworów a stężeniem DCM metabolizowanego za pośrednictwem układu oksygenaz mikrosomalnych o mieszanej funkcji (MFO). Na podstawie modelu PB-BK obliczono docelowe stężenie DCM w tkankach i okazało się, że w przypadku ludzi narażonych na małe stężenia DCM są one 14–170 razy niższe niż oczekiwane na podstawie liniowej ekstrapolacji danych uzyskanych za pomocą wielostopniowej metody szacowania ryzyka. Andersen sugeruje, że metoda wielostopniowa znacznie przeszacowuje ryzyko u ludzi narażonych na niewielkie stężenia DCM.

Wziąwszy pod uwagę wyniki badań epidemiologicznych i różnice w metabolizmie DCM u zwierząt i ludzi, wydaje się, że działania rakotwórczego nie można uznać za skutek krytyczny dla ludzi. Ryzyko związane z narażeniem zawodowym na DCM wiązałoby się zatem przede wszystkim z jego wpływem na OUN. Zaburzenia czynności OUN w warunkach ostrego i przewlekłego narażenia notowano zarówno u ludzi, jak i u zwierząt doświadczalnych. Wartość NOAEL dla działania przewlekłego na OUN oscyluje w granicach 353–794 mg/m^3 (27). W ocenie ryzyka należy jednak uwzględnić potencjalne działanie rakotwórcze i mutagenne DCM, wprowadzając odpowiedni współczynnik modyfikacyjny. W światowych wykazach normatywów higienicznych w większości państw dopuszczalne stężenia DCM ustalono w zakresie od 174 do 350 mg/m^3 . Podstawą ustalenia wartości dopuszczalnego poziomu narażenia przez ACGIH na poziomie 174 mg/m^3 były badania neurobehawioralne u ludzi. Wydaje się celowe rozważenie konieczności weryfikacji obowiązującej w Polsce wartości NDS, w świetle istniejących toksykologicznych danych literaturowych.

Za podwyższeniem wartości normatywów higienicznych DCM przemawiają wyniki uzyskane z badań

lekarskich i profilaktycznych, udostępnionych przez Państwową Inspekcję Sanitarną w 2006 r. U badanych pracowników narażonych zawodowo w ciągu trzech lat na działanie tego związku nie stwierdzono ostrych i przewlekłych ujemnych skutków narażenia. Badania przeprowadzane co 6 miesięcy obejmowały badanie ogólnolekarskie, neurologiczne, badanie elektrokardiograficzne, badania hematologiczne, moczu, poziom aminotransferazy, bilirubiny i kreatyniny. Ponadto u każdego pracownika przez 5 dni roboczych oznaczano stężenie karboksyhemoglobiny po zakończeniu zmiany roboczej. Wyniki tego badania nie wykazały wzrostu poziomu stężenia COHb powyżej 3,5%.

W świetle powyższych rozważań DCM nie można uznać za kancerogen zawodowy. Niezbędna jest jednak powtórna ocena ryzyka występowania raka u ludzi, gdy tylko będą dostępne wyniki nowych badań epidemiologicznych i farmakokinetycznego modelowania.

PIŚMIENNICTWO

1. Barański B., Sitarek K.: Dwuchlorometan. Dokumentacja proponowanych wartości dopuszczalnych poziomów narażenia zawodowego. Biuletyn Międzyresortowej Komisji ds Aktualizacji Wykazu Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy. Zeszyt 10. Warszawa 1994
2. Kryteria zdrowotne środowiska. Tom 32: Chlorek metylenu. IMP, Łódź 1992
3. Bernardini P., DiDonna V., Rimatori V.: [An episode of acute poisoning with methylene chloride and experimental evaluation of the exposure] Episodio di intossicazione acuta da cloruro di metilene (DCM) e valutazione sperimentale dell'esposizione. *Med. Lav.* 1984;75(2):133-138
4. Winek C.-L., Collom W.D., Esposito F.: Accidental methylene chloride fatality. *Forensic. Sci. Int.* 1981;18(2):165-168
5. Tariot P.N.: Delirium resulting from methylene chloride exposure: case report. *J. Clin. Psychiatry* 1983;44:340
6. Christenson E.K.J., Huizinga T.A.: Fatal case of methylene chloride intoxication. *Pharmaceutisch Weekblad.* 1971;106:301
7. Collier H.: Methylene dichloride intoxication in industry. *Lancet* 1936;1:594-595
8. Miller L., Pateras V., Friederici H., Engel G.: Acute tubular necrosis after inhalation exposure to methylene chloride. Report of a case. *Arch. Intern. Med.* 1985;145:145
9. Moskowitz S., Sharpio H.: Fatal exposure to methylene chloride vapor. *Ind. Hyg. Occup. Med.* 1952;5:116-123
10. Hanke C., Ruppe K., Otto J.: Results of studies on the toxic effects of dichloromethane in floor. Tile Setters. *Zentralbl. Gesamte. Hyg.* 1974;20:81-84
11. Fagin J., Bradley J., Williams D.: Carbon monoxide poisoning secondary to inhaling methylene chloride. *Br. Med. J.* 1980;281(6253):1461
12. Bakinson M.A., Jones R.D.: Gassings due to methylene chloride, xylene, toluene, and styrene reported to Her Majesty's Factory Inspectorate 1961-1980. *Br. J. Ind. Med.* 1985;42(3):184-190
13. Bonventre J., Brennan O., Jason D., Henderson A., Bastos M.L.: Two deaths following accidental inhalation of dichloromethane and 1,1,1-trichloroethane. *J. Anal. Toxicol.* 1977;1:158-160
14. Hall A.H., Rumack B.H.: Methylene chloride exposure in furniture-stripping shops: ventilation and respirator use practices. *J. Occup. Med.* 1990;32:33-41
15. Leikin J.B., Kaufman D., Libscomb J.W. i wsp.: Methylene chloride: report of five exposures and two deaths. *Am. J. Emerg. Med.* 1990;8:534-537
16. Stewart R., Hake C., Wu A.: Use of breath analysis to monitor methylene chloride exposure. *Scand. J. Work. Environ. Health* 1976;2:57-70
17. Buie S.E., Pratt D.S., May J.J.: Diffuse pulmonary injury following paint remover exposure. *Am. J. Med.* 1986;81(4):702-704
18. Lehmann K.B., Flury F.: Toxicology and hygiene of industrial solvents. Williams & Wilkins Company, Baltimore 1943
19. Putz V.R., Johnson B.L., Setzer J.V.: A comparative study of the effects of carbon monoxide and methylene chloride on human performance. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 1976;2:97-112
20. Fodor G.G., Winneke G.: Nervous system disturbance in men and animals experimentally exposed to industrial solvent vapors. In: Proceedings of the 2nd International Clean Air Congress. H.M. England, Ed. Academic Press. 1971, ss. 238-243
21. Stewart R.D., Fisher T.N., Hosko M.J., Peterson J.E., Baretta E.D., Dodd H.C.: Experimental human exposure to methylene chloride. *Arch. Environ. Health* 1972;25:342-348
22. Winneke G., Fodor G.G., Schlipkoter H.W.: Carbon Monoxide, Trichloroethylene, and Alcohol: Reliability and Validity of Neurobehavioral Effects. In: Multidisciplinary Perspectives in Event Related Brain Potential Research. D.A. Otto, Ed. U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC 1978
23. Gamberale F., Annwall G., Hultengren M.: Exposure to Methylene Chloride. II. Psychological Functions. *Scand. J. Work Environ. Health* 1975;1(2):95-103
24. DiVincenzo G.D., Yanno F.J., Astill, B.D.: Human and canine exposure to methylene chloride vapor. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1972;33:125-135
25. Winneke G.: Behavioral effects of methylene chloride and carbon monoxide as assessed by sensory and psychomotor performance. In: Behavioral toxicology early detection of occupational hazards. C. Xintaras, B.L., Johnson and I. de Groot, Eds. National Institute for Occupational Safety and Health, Washington, DC 1974
26. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH): Dichloromethane. In: Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices (TLVs and BEIs). Cincinnati, Ohio 2006
27. Lash A.A., Becker C.E., So Y., Shore M.: Neurotoxic effects of methylene chloride: are they long lasting in humans? *Br. J. Ind. Med.* 1991;48:418-426
28. Soden K.J., Marras G., Amsel J.: Carboxyhemoglobin levels in methylene chloride exposed employees. *J. Occup. Environ. Med.* 1996;38(4):367-371

29. DiVincenzo G.D., Kaplan C.J.: Uptake, metabolism, and elimination of methylene chloride vapor by humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1981a;59:130–140
30. DiVincenzo G.D., Kaplan C.J.: Effect of exercise or smoking on the uptake, metabolism, and excretion of methylene chloride vapor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1981b;59:141–148
31. WHO World Health Organization Regional Office for Europe. *Air Quality Guidelines for Europe.* Copenhagen 1987;23
32. Ott M.G., Skory L.K., Holder B.B. Bronson J.M., Williams M.S.: Health evaluation of employees occupationally exposed to methylene chloride—general study design and environmental considerations. *Scand. J. Work Environ. Health* 1983a;9(1):1–7
33. Ott M.G., Skory L.K., Holder B.B. Bronson J.M., Williams M.S.: Health evaluation of employees occupationally exposed to methylene chloride mortality. *Scand. J. Work Environ. Health* 1983b;9(1):8–16
34. Ott M.G., Skory L.K., Holder B.B. Bronson J.M., Williams M.S.: Health evaluation of employees occupationally exposed to methylene chloride: clinical laboratory evaluation. *Scand. J. Work Environ. Health* 1983c;9(1):17–25
35. Ott M.G., Skory L.K., Holder B.B., Bronson J.M., Williams M.S.: Health evaluation of employees occupationally exposed to methylene chloride twenty four hour electrocardiographic monitoring. *Scand. J. Work Environ. Health* 1983d;9(1):26–30
36. Friedlander B.R., Hearne T., Hall S.: Epidemiologic investigation of employees chronically exposed to methylene chloride. *J. Occup. Med.* 1978;20(10):657–666
37. Hearne F.T., Grose F., Pifer J.W., J.W., Friedlander B.R., Raleigh R.L.: Methylene chloride mortality study: dose–response characterization and animal model comparison. *J. Occup. Med.* 1987;29(3):217–228
38. Lanes S.F., Cohen A., Rothman K.J., Soden K.J.: Mortality of cellulose fiber production workers. *Scand. J. Work Environ. Health* 1990;16:247–251
39. Lanes S.F., Rothman K.J., Dreyer N.A., Soden K.J.: Mortality update of cellulose fiber production workers. *Scand. J. Work Environ. Health* 1993;19(19):426–428
40. Gibbs G.W., Amsel J., Soden K.: A cohort mortality study of cellulose triacetate-fiber workers exposed to methylene chloride. *J. Occup. Environ. Med.* 1996;38(7):693–697
41. U.S. EPA: Health assessment document for dichloromethane (methylene chloride). Washington DC US Environmental Protection Agency. 1985a; Final Report nr EPA-600/8-82-004F
42. U.S. EPA.: Addendum to the Health Assessment Document for Dichloromethane (methylene chloride). Updated carcinogenicity assessment. Prepared by the Carcinogen Assessment Group, OHEA, Washington, DC. EPA/600/8-82/004FF, 1985b
43. U.S. EPA.: Update to the Health Assessment Document and Addendum for Dichloromethane (Methylene Chloride): Pharmacokinetics, Mechanism of Action and Epidemiology. Review Draft. Office of Health and Environmental Assessment, Washington, DC. EPA/600/8-87/030A, 1987a
44. International Agency for Research on Cancer: Monograph on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Re-Evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide. 1986;41:43–85
45. International Agency for Research on Cancer: Monograph on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Some Halogenated Hydrocarbons and Pesticide Exposures. 1999;41:251
46. Guide to Occupational Exposure Values 2006. Compiled by ACGIH
47. Annex I to Directive 67/548/EEC with subsequent amendments (last: 29 ATP to Directive 67/548/EEC, 2004/73/EC of April 2004, OJ L 152)
48. NCA National Coffee Association.: 24-Month chronic toxicity and oncogenicity study of methylene chloride in rats. Final Report. Prepared by Hazleton Laboratories America, Inc., Vienna, VA. (Unpublished) 1982. Cyt za International Risk Information System (71)
49. NCA (National Coffee Association): Twenty-four month oncogenicity study of methylene chloride in mice. Final Report. Prepared by Hazleton Laboratories, America, Inc., Vienna, VA 1983
50. Burek J.D., Nitschke K.D., Bell T.J., Wackerle D.L., Childs R.C., Beyer J.E. i wsp.: Methylene chloride a two year inhalation toxicity and oncogenicity study in rats and hamsters. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1984;4:30–47
51. U.S. National Toxicology Program: Toxicology and Carcinogenesis Studies of Dichloromethane (Methylene Chloride) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC 1986
52. Serota D.G., Thakur A.K., Ulland B.M., Kirschman J.C., Brown N.M., Coots R.H. i wsp.: A two year drinking water study of dichloromethane in rodents. II. Mice. *Food. Chem. Toxicol.* 1986a;24:959–963
53. Serota D.G., Thakur A.K., Ulland B.M., Kirschman J.C., Brown N.M., Coots R.H. i wsp.: A two year drinking water study of dichloromethane in rodents. I. Rats. *Food. Chem. Toxicol.* 1986b;24:951–958
54. Maltoni C., Cotti, G., Perino G.: Long term carcinogenicity bioassays on methylene chloride administered by ingestion to Sprague Dawley rats and Swiss mice and by inhalation to Sprague Dawley rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1988;534:352–366
55. Kari F.W., Foley J.F., Seilkop S.K., Maronpot R.R., Anderson M.W.: Effect of varying exposure regiment on methylene chloride induced lung and liver tumors in female B6C3F1 mice. *Carcinogenesis* 1999;71:251–315
56. Nitschke K.D., Burek J.D., Bell T.J., Kociba R.J., Rampy L.W., McKenna M.J.: Methylene chloride, a two year inhalation toxicity and oncogenicity study in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1988;11:48–59
57. U.S. EPA.: Technical Analysis of New Methods and Data Regarding Dichloromethane Hazard Assessments. Review Draft. Office of Health and Environmental Assessment, Washington, DC. EPA/600/8-87/029A 1987b
58. Ahmed A.E., Anders M.W.: Metabolism of dihalomethanes to formaldehyde and inorganic halide. i. *in vitro* studies. *Drug Metab. Dispos.* 1976;4:357–361

59. Jongen W.M.F., Harmsen E.G.M., Alink G.M., Koeman J.H.: The effect of glutathione conjugation and microsomal oxidation on the mutagenicity of dichloromethane in *S. typhimurium*. *Mutat. Res.* 1982;95:183–189
60. Casanova M., Bell D.A., Heck H.A.: Dichloromethane metabolism to formaldehyde and reaction of formaldehyde with nucleic acids in hepatocytes of rodents and humans with and without glutathione S-transferase T1 and M1 genes. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1997;37:168–180
61. Casanova M., Deyo D.F., Heck H.: Dichloromethane (methylene chloride): metabolism to formaldehyde and formation of DNA-protein cross links in B6C3F1 mice and Syrian golden hamster. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1992;114:162–165
62. Kubic V.L., Anders M.W.: Metabolism of dihalomethanes to carbon monoxide. ii. *in vivo* studies. *Drug Metab. Dispos.* 1975;3:104–112
63. Kubic V.L., Anders M.W.: Metabolism of dihalomethanes to carbon monoxide. III. studies on the mechanism of the reaction. *Biochem. Pharmacol.* 1978;27:2349–2355
64. Mainwaring G.W., Nash J., Davidson M. i wsp.: Isolation of mouse Theta glutathione S-transferase active with methylene chloride. *Biochem. J.* 1996a;314:445–448
65. Sherratt P.J., Pulford D.J., Harrison D.J., Green T., Hayes J.D.: Evidence that human class Theta glutathione S-transferase T1-1 can catalyse the activation of dichloromethane, a liver and lung carcinogen in the mouse: Comparison of the tissue distribution of GSST T1-1 with that of classes alpha, mu and pi GST in human. *Biochem. J.* 1997;326: 837–846
66. Mainwaring G.W., Williams S.M., Foster J.R., Tugwood J., Green T.: The distribution of theta-class glutathione S-transferases in the liver and lung of mouse, rat and human. *Biochem. J.* 1996b;318:297–303
67. Green T.: Methylene chloride induced mouse liver and lung tumors: An overview of the role of mechanistic studies in human safety assessment. *Human Exp. Toxicol.* 1997;16:3–13
68. Reitz R.H., Mendrala A.R., Guengerich F.P.: In vitro metabolism of methylene chloride in human and animal tissues: Use in physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1989;97:230–246
69. Andersen M., Clewell H., Gargas M., MacNaughton M.G., Reitz R.H., Nolan R.J. i wsp.: Physiologically based pharmacokinetic modeling with dichloromethane, its metabolite, carbon monoxide, and blood carboxyhemoglobin in rats and humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1991;108:14–27
70. Andersen M.E., Clewell H.J., Gargas M.L., Smith F.A., Reitz R.H.: Physiologically based pharmacokinetics and the risk assessment process for methylene chloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1987;87:185–205
71. IRIS — International Risk Information System. Baza danych na CD, 2006